

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau



3

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁵ : C07H 15/12, C12Q 1/68 C12N 15/00	A1	(11) International Publication Number: WO 91/09045 (43) International Publication Date: 27 June 1991 (27.06.91)
(21) International Application Number: PCT/US90/07333 (22) International Filing Date: 13 December 1990 (13.12.90) (30) Priority data: 451,953 19 December 1989 (19.12.89) US 575,524 31 August 1990 (31.08.90) US (71) Applicant: THE UNITED STATES OF AMERICA, represented by THE SECRETARY, UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE [US/US]; Washington, DC 20231 (US). (72) Inventor: YANG, Stringner, Sue ; 6625 Marywood Road, Bethesda, MD 20817 (US). (74) Agents: OLIFF, James, A. et al.; Oliff & Berridge, P.O. Box 19928, Alexandria, VA 22320 (US).		(81) Designated States: AT (European patent), AU, BE (European patent), CA, CH (European patent), DE (European patent), DK (European patent), ES (European patent), FR (European patent), GB (European patent), GR (European patent), IT (European patent), JP, KR, LU (European patent), NL (European patent), SE (European patent). Published <i>With international search report.</i>
(54) Title: HEPATOCELLULAR CARCINOMA ONCOGENE (57) Abstract The present invention relates to an oncoprotein specific for hepatocellular carcinomas and to a nucleotide sequence that codes for such a protein. The invention further relates to screening and diagnostic methodologies (and kits based thereon) that make use of the oncoprotein (or antibodies specific for same) and the nucleotide sequence.		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3091870号
(P3091870)

(45) 発行日 平成12年 9 月25日 (2000. 9. 25)

(24) 登録日 平成12年 7 月28日 (2000. 7. 28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	D
			N
C 0 7 K 14/82		C 0 7 K 14/82	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	

請求項の数23(全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-501976	(73) 特許権者	999999999 アメリカ合衆国 アメリカ合衆国, ディストリクト オブ コロンビア 20231, ワシントン (番地表示なし)
(86) (22) 出願日	平成2年12月13日(1990. 12. 13)	(72) 発明者	ヤング, スtringナー スエ アメリカ合衆国, メリーランド 20817, ベセスダ, メリーウッド ロード 6625
(65) 公表番号	特表平4-506459	(74) 代理人	999999999 弁理士 粁 経夫 (外1名)
(43) 公表日	平成4年11月12日(1992. 11. 12)	合議体	
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 0 / 0 7 3 3 3	審判長	田村 明照
(87) 国際公開番号	W O 9 1 / 0 9 0 4 5	審判官	佐伯 裕子
(87) 国際公開日	平成3年6月27日(1991. 6. 27)	審判官	眞壽田 順啓
審査請求日	平成4年6月19日(1992. 6. 19)		
審判番号	平8-18830		
審判請求日	平成8年11月5日(1996. 11. 5)		
(31) 優先権主張番号	4 5 1, 9 5 3		
(32) 優先日	平成1年12月19日(1989. 12. 19)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	5 7 5, 5 2 4		
(32) 優先日	平成2年8月31日(1990. 8. 31)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝細胞の癌の癌遺伝子

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の配列1中に記載されているヌクレオチド79ないし81に示されるMetで始まりそしてヌクレオ

2

チド1477ないし1479に示されるHisで終わるアミノ酸配列を持つタンパク質をコードしている核酸配列、又は該核酸配列のアレル異性体からなるDNA断片:

27
 AAG CTT AAT AGA AAA TAT GAG CAA CAT ACA CAA ACA TTA GCA ACA ATG ATA TAA AAT ACC ACT TAA ACA TAA GGA AAA ATG
 81
 MET

108
 TTE CCC TTC ACT TGT GGA AGA AAT GCA AAT GAA AAC AGC CCT AGG GAT GTT GAC GTT GGG GTG GCA CCT GCT GCA GAG GGT
 Leu Pro Phe Thr Cys Gly Arg Asn Ala Asn Glu Asn Ser Pro Arg Asp Val Asp Val Gly Val Ala Pro Ala Ala Glu Gly

135
 162
 243

189
 AAC GTG CAG CAT GTC GAG GGC AGC ACT GCC AAG GCT GGT TTG AGC TCA AGG TCA GGT GGA GGA GGT AGT CTC TCC CAT CTC
 Asn Val Gln His Val Glu Gly Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu Ser Ser Arg Ser Gly Gly Gly Ser Leu Ser His Leu

216
 243

270
 TTC TGC GAG TGC AGC TCT AAA CCC TGC CTG AAA CAC GTG GAG AAG CTA TCT GAG CTG CCT CCA GGA CAC ATG CAA ATG GAC
 Phe Cys Glu Cys Ser Ser Lys Pro Cys Lys Lys His Val Glu Lys Leu Ser Glu Leu Pro Pro Gly His MET Gln MET Asp

297
 324

351
 ACT CTG ATC ATA AAA TTA TCA GGA AGA TTG AGA AAT AAG ACA AAA ATG GAG GTG CCA CCA AAC CAG TGG AAA TTT TTC CCC
 Thr Leu Ile Ile Lys Leu Ser Gly Arg Leu Arg Asn Lys Thr Lys MET Glu Val Pro Pro Asn Gln Trp Lys Phe Phe Pro

378
 405

432
 TTT TCA TTC CTC TGG CAT TCC CTG GCC TTG ACT CAA GGC AGC CCA CAC TCT AGG AGC AGA CAC CAG GGC ACA GGT GGG GAG
 Phe Ser Phe Leu Trp His Ser Leu Ala Leu Thr Gln Gly Ser Pro His Ser Arg Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Gly Glu

459
 486

513
 CTC TGG GGG ACC CTC CAG GCT TAC TCA GTG AAT GGG TTA GCA GCA GCC ACA GGA GCC ACC ATG GAG CCT GCA GGG ACC CAC
 Leu Trp Gly Thr Leu Gln Ala Tyr Ser Val Asn Gly Leu Ala Ala Thr Gly Ala Thr MET Glu Pro Ala Gly Thr His

540
 567

594 AAC ACT GAG GGC AGG GAT CTT GCC TCT AAT CAG ATA AGC TGT GAT TCC CGA GAG GGT GGG GTA AAG GCC ACG GGT CTT TTT 648
 Asn Thr Glu Gly Arg Asp Leu Ala Ser Asn Gln Ile Ser Cys Asp Ser Arg Glu Gly Val Lys Ala Thr Gly Leu Phe
 621
 702 CTC TCC ACA TCT TCC CAC GTC ATG ACC CCA GAG GGT CGA AGA GGG AGA AAG TGT GAG CAC CGT GAC ATA ATG AGC CGC AGC 729
 Leu Ser Thr Ser Ser His Val MET Thr Pro Glu Gly Arg Arg Gly Arg Lys Cys Glu His Arg Asp Ile MET Ser Arg Ser
 756 783 CTT CTG ACT AGA TGC CCC AAA GAA GAA TCC CAG GTG ACC ACA CAG CAT CAG AGA AAC TGC AGG GTA ATG AGG AAC TTT GGA 810
 Leu Leu Thr Arg Cys Pro Lys Glu Glu Ser Gln Val Thr Thr Gln His Gln Arg Asn Cys Arg Val MET Arg Asn Phe Gly
 837 864 AAG CAA TCC ATC GTG TTG TCA GTA AAA CCT CTG GCT CAC TCC CGA GCT GGG CAT GCA TGG ATG GTG ACC CTC GAT GGA ATA 891
 Lys Gln Ser Ile Val Leu Ser Val Lys Pro Leu Ala His Ser Arg Ala Gly His Ala Trp MET Val Thr Leu Asp Gly Ile
 918 947 GAC TAT GAG GAA CCA GGT GAG GGG ATC TAC CTC CAC CGA GAC GTG AGA GTG ACC TGC ATA CCC AAA CAC CAT GAG GCT TTA 974
 Asp Tyr Glu Glu Pro Gly Glu Gly Ile Tyr Leu His Arg Asp Val Arg Val Thr Cys Ile Pro Lys His His Glu Ala Leu
 999 1028 AAG ACT GAG CTG ATG TGG AAG CCA CAG CCT CTG CAG GTT GCT CTG CAC TTG CAA CAT AAG CCC AAC CAC ATC AAT TGC TGC 1053
 Lys Thr Glu Leu MET Trp Lys Pro Gln Pro Leu Gln Val Ala Leu His Leu Gln His Lys Pro Asn His Ile Asn Cys Cys
 1080 1107 AAA ACA AAA CTA CAG CAT TCT CCA TAC CAC TTA AAT AAG ACA CAG AGT CTC ACA ACA TTC AAA ACG CCC AGG ACA CAA TCC 1134
 Lys Thr Lys Leu Gln His Ser Pro Tyr His Leu Asn Lys Thr Gln Ser Leu Thr Thr Phe Lys Thr Pro Arg Thr Gln Ser

1161 1188 1215
 AAA ATT ACT TCT ACA AAA AAT CAG GAA AAT CTC AAT GAG CAA GGA AAA TGG CAA TCA GTA GCT GCC AGT GCT GAG ATG ACA
 Lys Ile Thr Ser Thr Lys Asn Gln Glu Asn Leu Asn Glu Gln Gly Lys Trp Gln Ser Val Ala Ala Ser Ala Glu MET Thr

 1248 1270 1296
 ATG AGG GTT GGA ATC AAC ATC TTT AAA GTA ATT ATC ATA AGC ATT CTC CAG CAA GTA ATG GCA AAC ACT CTT GAG ATA
 MET Arg Val Gly Ile Ile Asn Ile Phe Lys Val Ile Ile Ser Ile Leu Glu Gln Val MET Ala Asn Thr Leu Glu Ile

 1323 1350 1377
 AAT GGA AAG ATA AGA AGG CTC AGG GAG AAA GTG GAA TGT ACA AAG AAT GAC CAA GTG GGA ATT GCA CCA CTG GAA ACA AAT
 Asn Gly Lys Ile Arg Arg Leu Arg Glu Lys Val Glu Cys Thr Lys Asn Asp Gln Val Gly Ile Ala Pro Leu Glu Thr Asn

 1404 1431 1458
 CAC CAG GAT AAA GCA GTC TCT GGC TGG GCC AAC AGG AGA ATG GAA ATG AAA AGG GAA AGA GTT GTT ATG GCA GTT GTC CAA
 His Gln Asp Lys Lys Ala Val Ser Gly Trp Trp Ala Asn Arg Arg MET Glu MET Lys Arg Glu Arg Val Val MET Ala Val Val Gln

 1485 1512 1539
 TTT GAA CAA CAC AAA AGA CAC TGA TTT AAA AAA AAA TGA GGC AGG GCT CAG TGG CTC ACA CQT ATA ATC CCA ATA CCT TGG
 Phe Glu Gln His Lys Arg His

 1566 1593 1620
 GAG GCC GAG GCA ATG TAT CAC CTG AGG TCA GGA GTT CAA GAC TAC CCT GGC CAA CAT GGC AAA ATC CCA TCT CTA CTG AAA
 MET Tyr His Leu Arg Ser Gly Val Gln Asp Tyr Pro Gly Gln His Gly Lys Ile Pro Ser Leu Leu Lys

 1647 1674 1701
 ATA CAA GAA TTA GCT GGG CAT GGT GGC AGG TGC CTG CAA TCC CAG CTA CTC AGG AGG CTG AGG CAG GAG AAT CAC TTG AAC
 Ile Gln Glu Leu Ala Gly His Gly Arg Cys Leu Gln Ser Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg Gln Glu Asn His Leu Asn

1728	TCG GGA GGT AGA GGG TGC AGT GAG CCA AAA TCG CAC CTC TGC ATT CCA GCC TGG GTG ACA GAG GGA GAC TCT GTC TCA AAA Ser Gly Gly Arg Cys Ser Lys Pro Lys Ser His Leu Cys Ile Pro Ala Trp Val Thr Glu Gly Asp Ser Val Ser Lys	1755	1782
1809	CAA AAC AAA ACA AAA AAT GAA CAG CAC CTC AGG AAC AAT ACC AAA AAG TCC AAC AGC TGT ATA ATT GGT GGC CCA GAA GGA Gln Asn Lys Thr Lys Asn Glu Gln His Leu Arg Asn Asn Thr Lys Ser Ser Asn Ser Cys Ile Ile Gly Gly Pro Glu Gly	1836	1863
1890	GAG GAG AAA GAG TGG AGT ACA GAA ATG AGA TCT GAA GAA CTA ATG ACT GAT AAT GTT TCA ATT TTG AAA AAG GAC ATA AAC Glu Glu Lys Lys Glu Trp Ser Thr Glu MET Arg Ser Glu Glu Leu MET Thr Asp Asn Val Ser Ile Leu Lys Lys Asp Ile Asn	1917	1944
1971	CTA AAG ATT ATA GAT TCA AAA GCC CAG CTG AAT TCA AAT AGG ATA AAT ACA GAT GCA GAT ATA TTA TCA TTA AAC TGT GAA Leu Lys Ile Ile Asp Ser Lys Lys Ala Gln Leu Asn Ser Asn Arg Ile Asn Thr Asp Ala Asp Ile Leu Ser Leu Asn Cys Glu	1998	2024
2052	ATA AAT TGG TTT TGT CAC AAG CCA GCA TTG TCA CTG TGG GAG AAA AGA GAT CAA AAG TAC ACA AGG AAG GAA GGA AAT ACA Ile Asn Trp Phe Cys His Lys Lys Pro Ala Leu Ser Leu Trp Glu Lys Arg Asp Gln Lys Tyr Thr Arg Lys Glu Gly Asn Thr	2079	2106
2133	GAA TAT TAT GGC CAT GGG AAA GAG GTG TCA GTG TGA ATA CAT AGA ACA GCA CAC TTA AGC AAC AAC CCC AAA TGA TGG GGC Glu Tyr Tyr Gly His Gly Lys Glu Val Ser Val • Ile His Arg Thr Ala His Leu Ser Asn Asn Pro Lys • Trp Gly	2160	2187

配列 1 (続き)

【請求項2】配列1に記載されているヌクレオチド79ないし1479の核酸配列を持つ請求項1記載のDNA断片。

【請求項3】 i) ベクター、および
ii) 請求項1記載の該DNA断片
からなる組換えDNA分子。

【請求項4】該DNA断片が配列1に記載されているヌクレオチド79ないし1479の核酸配列を持つ請求項3記載の組換えDNA分子。

【請求項5】該DNA断片に作動できるように結合しているプロモーターを更に含有する請求項3または4記載の

組換えDNA分子。

【請求項6】請求項3ないし5のいずれかに記載の組換えDNA分子で形質転換された宿主細胞。

【請求項7】該細胞が原核細胞である請求項6記載の宿主細胞。

【請求項8】該細胞がE. coli細胞である請求項7記載の宿主細胞。

【請求項9】請求項1または2記載のDNA断片とストリ

ンジェントなハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成するために該DNA断片に十分に相補的であるヒト癌ヌクレオチド断片。

【請求項10】下記の配列1中に記載されているヌクレオチド79ないし1479の核酸配列又は該核酸配列のアレル異性体を持つDNA断片によりコードされているタンパク質：

27
 AAG CTT AAT AGA AAA TAT GAG CAA CAT ACA CAA ACA TTA GCA ACA ATG ATA TAA AAT ACC ACT TAA ACA TAA GGA AAA ATG MET

108
 TTG CCC TTC ACT TGT GGA AGA AAT GCA AAT GAA AAC AGC CCT AGG GAT GTT GAC GTT GGG GTG GCA CCT GCT GCA GAG GGT
 Leu Pro Phe Thr Cys Gly Arg Asn Ala Asn Glu Asn Ser Pro Arg Asp Val Asp Val Gly Val Ala Pro Ala Ala Glu Gly

135
 AAC GTG CAG CAT GTC GAG GGC AGC ACT GCC AAG GCT GGT TTG AGC TCA AGG TCA GGT GGA GGA GGT AGT CTC TCC CAT CTC
 Asn Val Gln His Val Glu Gly Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu Ser Ser Arg Ser Gly Gly Gly Ser Leu Ser His Leu

162
 TTC TGC GAG TGC AGC TCT AAA CCC TGC CTG AAA CAC GTG GAG AAG CTA TCT GAG CTG CCT CCA GGA CAC ATG CAA ATG GAC
 Phe Cys Glu Cys Ser Lys Pro Cys Lys Lys His Val Glu Lys Ser Glu Leu Pro Pro Gly His MET Gln MET Asp

189
 ACT CTG ATC ATA AAA TTA TCA GGA AGA TTG AGA AAT AAG ACA AAA ATG GAG GTG CCA CCA AAC CAG TGG AAA TTT TTC CCC
 Thr Leu Ile Ile Lys Leu Ser Gly Arg Leu Arg Asn Lys Thr Lys MET Glu Val Pro Pro Asn Gln Trp Lys Phe Pro

216
 TTT TCA TTC CTC TGG CAT TCC CTG GCC TTG ACT CAA GGC AGC CCA CAC TCT AGG AGC AGA CAC CAG GGC ACA GGT GGG GAG
 Phe Ser Phe Leu Trp His Ser Leu Ala Leu Thr Gln Gly Ser Pro His Ser Arg Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Gly Glu

243
 CTC TGG GGG ACC CTC CAG GCT TAC TCA GTG AAT GGG TTA GCA GCA GCC ACA GGA GCC ACC ATG GAG CCT GCA GGG ACC CAC
 Leu Trp Gly Thr Leu Gln Ala Tyr Ser Val Asn Gly Leu Ala Ala Thr Gly Ala Thr MET Glu Pro Ala Gly Thr His

270
 297
 324

351
 378
 405

432
 459
 486

513
 540
 567

594 AAC ACT GAG GGC AGG GAT CTT GCC TCT AAT CAG ATA AGC TGT GAT TCC CGA GAG GGT GGG GTA AAG GCC ACG GGT CTT TTT 648
 Asn Thr Glu Gly Arg Asp Leu Ala Ser Asn Gln Ile Ser Cys Asp Ser Arg Glu Gly Val Lys Ala Thr Gly Leu Phe
 621
 702 CTC TCC ACA TCT TCC CAC GTC ATG ACC CCA GAG GGT CGA AGA GGG AGA AAG TGT GAG CAC CGT GAC ATA ATG AGC CGC AGC 729
 Leu Ser Thr Ser Ser His Val MET Thr Pro Glu Gly Arg Arg Gly Arg Lys Cys Glu His Arg Asp Ile MET Ser Arg Ser
 756
 783 CTT CTG ACT AGA TGC CCC AAA GAA GAA TCC CAG GTG ACC ACA CAG CAT CAG AGA AAC TGC AGG GTA ATG AGG AAC TTT GGA 810
 Leu Leu Thr Arg Cys Pro Lys Glu Glu Ser Gln Val Thr Thr Gln His Gln Arg Asn Cys Arg Val MET Arg Asn Phe Gly
 837
 864 AAG CAA TCC ATC GTG TTG TCA GTA AAA CCT CTG GCT CAC TCC CGA GCT GGG CAT GCA TGG ATG GTG ACC CTC GAT GGA ATA 891
 Lys Gln Ser Ile Val Leu Ser Val Lys Pro Leu Ala His Ser Arg Ala Gly His Ala Trp MET Val Thr Leu Asp Gly Ile
 918
 947 GAC TAT GAG GAA CCA GGT GAG GGG ATC TAC CTC CAC CGA GAC GTG AGA GTG ACC TGC ATA CCC AAA CAC CAT GAG GCT TTA 974
 Asp Tyr Glu Glu Pro Gly Glu Gly Ile Tyr Leu His Arg Asp Val Arg Val Thr Cys Ile Pro Lys His His Glu Ala Leu
 999
 1028 AAG ACT GAG CTG ATG TGG AAG CCA CAG CCT CTG CAG GTT GCT CTG CAC TTG CAA CAT AAG CCC AAC CAC ATC AAT TGC TGC 1053
 Lys Thr Glu Leu MET Trp Lys Pro Gln Pro Leu Gln Val Ala Leu His Leu Gln His Lys Pro Asn His Ile Asn Cys Cys
 1080
 1107 AAA ACA AAA CTA CAG CAT TCT CCA TAC CAC TTA AAT AAG ACA CAG AGT CTC ACA ACA TTC AAA ACG CCC AGG ACA CAA TCC 1134
 Lys Thr Lys Leu Gln His Ser Pro Tyr His Leu Asn Lys Thr Gln Ser Leu Thr Thr Phe Lys Thr Pro Arg Thr Gln Ser

1161 1188 1215
 AAA ATT ACT TCT ACA AAA AAT CAG GAA AAT CTC AAT GAG CAA GGA AAA TGG CAA TCA GTA GCT GCC AGT GCT GAG ATG ACA
 Lys Ile Thr Ser Thr Lys Asn Gln Glu Asn Leu Asn Glu Gln Gly Lys Trp Gln Ser Val Ala Ala Ser Ala Glu MET Thr

 1248 1270 1296
 ATG AGG GTT GGA ATC AAC ATC TTT AAA GTA ATT ATC ATA AGC ATT CTC CAG CAA GTA ATG GCA AAC ACT CTT GAG ATA
 MET Arg Val Gly Ile Ile Asn Ile Phe Lys Val Ile Ile Ser Ile Leu Glu Gln Val MET Ala Asn Thr Leu Glu Ile

 1323 1350 1377
 AAT GGA AAG ATA AGA AGG CTC AGG GAG AAA GTG GAA TGT ACA AAG AAT GAC CAA GTG GGA ATT GCA CCA CTG GAA ACA AAT
 Asn Gly Lys Lys Ile Arg Arg Leu Arg Glu Lys Val Glu Cys Thr Lys Asn Asp Gln Val Gly Ile Ala Pro Leu Glu Thr Asn

 1404 1431 1458
 CAC CAG GAT AAA GCA GTC TCT GGC TGG GCC AAC AGG AGA ATG GAA ATG AAA AGG GAA AGA GTT GTT ATG GCA GTT GTC CAA
 His Gln Asp Lys Lys Ala Val Ser Gly Trp Ala Asn Arg Arg MET Glu MET Lys Arg Glu Arg Val Val MET Ala Val Val Gln

 1485 1512 1539
 TTT GAA CAA CAC AAA AGA CAC TGA TTT AAA AAA AAA TGA GGC AGG GCT CAG TGG CTC ACA CCT ATA ATC CCA ATA CCT TGG
 Phe Glu Gln His Lys Arg His

 1566 1593 1620
 GAG GCC GAG GCA ATG TAT CAC CTG AGG TCA GGA GTT CAA GAC TAC CCT GGC CAA CAT GGC AAA ATC CCA TCT CTA CTG AAA
 Tyr His Leu Arg Ser Gly Val Gln Asp Tyr Pro Gly Gln His Gly Lys Ile Pro Ser Leu Leu Lys

 1647 1674 1701
 ATA CAA GAA TTA GCT GGG CAT GGT GGC AGG TGC CTG CAA TCC CAG CTA CTC AGG AGG CTG AGG CAG GAG AAT CAC TTG AAC
 Ile Gln Glu Leu Ala Gly His Gly Arg Cys Leu Gln Ser Gln Leu Arg Arg Leu Arg Gln Glu Asn His Leu Asn

1728	TCG GGA GGT AGA GGG TGC AGT GAG CCA AAA TCG CAC CTC TGC ATT CCA GCC TGG GTG ACA GAG GGA GAC TCT GTC TCA AAG Ser Gly Gly Arg Cys Ser Ser Glu Pro Lys Ser His Leu Cys Ile Pro Ala Trp Val Thr Glu Gly Asp Ser Val Ser Lys	1755	1782
1809	CAA AAC AAA ACA AAA AAT GAA CAG CAC CTC AGG AAC AAT ACC AAA AAG TCC AAC AGC TGT ATA ATT GGT GGC CCA GAA GGA Gln Asn Lys Thr Lys Asn Glu Gln His Leu Arg Asn Asn Thr Lys Lys Ser Asn Ser Cys Ile Ile Gly Gly Pro Glu Gly	1836	1863
1890	GAG GAG AAA GAG TGG AGT ACA GAA ATG AGA TCT GAA GAA CTA ATG ACT GAT AAT GTT TCA ATT TTG AAA AAG GAC ATA AAC Glu Glu Lys Lys Glu Trp Ser Thr Glu MET Arg Ser Glu Glu Leu MET Thr Asp Asn Val Ser Ile Leu Lys Lys Asp Ile Asn	1917	1944
1971	CTA AAG ATT ATA GAT TCA AAA GCC CAG CTG AAT TCA AAT AGG ATA AAT ACA GAT GCA GAT ATA TTA TCA TTA AAC TGT GAA Leu Lys Ile Ile Asp Ser Lys Lys Ala Gln Leu Asn Ser Asn Arg Ile Asn Thr Asp Ala Asp Ile Leu Ser Leu Asn Cys Glu	1998	2024
2052	ATA AAT TGG TTT TGT CAC AAG CCA GCA TTG TCA CTG TGG GAG AAA AGA GAT CAA AAG TAC ACA AGG AAG GAA GGA AAT ACA Ile Asn Trp Phe Cys His Lys Lys Pro Ala Leu Ser Ser Leu Trp Glu Lys Arg Asp Gln Lys Tyr Thr Arg Lys Glu Gly Asn Thr	2079	2106
2133	GAA TAT TAT GGC CAT GGG AAA GAG GTG TCA GTG TGA ATA CAT AGA ACA GCA CAC TTA AGC AAC AAC CCC AAA TGA TGG GGC Glu Tyr Tyr Gly His Gly Lys Glu Val Ser Val • Ile His Arg Thr Ala His Leu Ser Ser Asn Asn Pro Lys • Trp Gly	2160	2187

図25 1 (続き)

【請求項11】配列1中に記載されているヌクレオチド79ないし81に示されるMetで始まりそしてヌクレオチド1477ないし1479に示されるHisで終わるアミノ酸配列を持つ請求項10記載のタンパク質。

【請求項12】請求項10または11記載の該タンパク質に

特異的な抗体。

【請求項13】該抗体がポリクローナルである請求項12記載の抗体。

【請求項14】請求項10ないし11記載のタンパク質を製造する方法であって；

a) 請求項3ないし5のいずれかに記載の組換えDNA分子で形質転換した宿主細胞を該DNA断片が発現されそしてその際該タンパク質が生産されるように条件下で培養し；そして

b) 該タンパク質を単離することからなる方法。

【請求項15】試料中の請求項10または11記載のタンパク質の存在を検出する方法であって；

a) 該タンパク質への抗体の結合が起こり得て、その際複合体が形成されるような条件下で、該タンパク質に特異的な該抗体を試料と接触せしめ；そして

b) 複合体の存在を検定することからなる方法。

【請求項16】該抗体が検出可能な標識体に結合してある請求項15記載の方法。

【請求項17】請求項10記載の該タンパク質をコードしているヌクレオチド配列の試料中の存在を検出する方法であって；

a) その試料を、ハイブリッド形成が起こり得て、それにより複合体が形成されるようなストリンジェントなハイブリッド形成条件下で、該ヌクレオチド配列に十分に相補的であるヌクレオチド断片に、そのヌクレオチド断片とハイブリッド形成させるために接触せしめ、そして

b) 該複合体の存在を検定することからなる方法。

【請求項18】該ヌクレオチド断片が検出可能な標識体に結合している請求項17記載の方法。

【請求項19】生物学的試料中の肝細胞癌の存在を診断する方法であって；

a) 該生物学的試料を請求項12または13記載の抗体と、該試料中に存在している該タンパク質への該抗体の結合が起こり得て、その際複合体が形成されるような条件下で、接触せしめ；そして

b) 該複合体の存在を検定することからなる方法。

【請求項20】該試料が組織試料である請求項19記載の方法。

【請求項21】細胞試料中の肝細胞癌の存在を診断する方法であって；

a) 該細胞試料から誘導された核酸配列を請求項9記載の該ヌクレオチド断片に、ハイブリッド形成が起こり得て、それにより複合体が形成されるような条件下で接触させ；そして

b) 該複合体の存在を検定することからなる方法。

【請求項22】試料中の請求項10または11記載のタンパク質の存在を検出するための診断キットであって；

該タンパク質に特異的な抗体を中に備えている容器からなるキット。

【請求項23】請求項1または2記載の該DNA断片の存

在を検出するための診断キットであって；

ストリンジェントなハイブリッド形成条件下で該DNA断片にハイブリッドするのに、該DNA断片に対して十分に相補的であるヒト癌ヌクレオチド断片を中に備えている容器からなるキット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、概して、肝癌細胞のタンパク質、および、特に、肝癌細胞の増幅遺伝子発現生産物である癌タンパク質に関する。本発明は更に癌タンパク質をコードしているヌクレオチド断片に、そのような断片を含有する組換え分子にそしてそれにより形質転換した細胞に関する。

本発明は患者体内の肝細胞癌の存在を検出する方法とそれに基づいたキットに関する。

背景

疫学的事実は、若干のDNAウイルスがヒトのある種の癌と他の疾病の発生の原因に深く関与していることを示している。これらのウイルスは、頸部癌 (HPV 16) とゆうぜい状表皮発育異常症におけるパピローマウイルス (HPV 3と8)；バーキットリンパ腫におけるエプシュタイン・バールウイルス；およびヒト肝細胞癌におけるB型肝炎ウイルス (HBV) を包含する [Vyas GN, Diens tag JL, Hoofnagle JH, 編纂, 「ウイルス肝炎と肝臓病」 (Viral hepatitis and liver disease) 中, Beasley 他, 1984, 209-224 (Orlando, FL, Grune and Stratton)]。

これらの観察は、成人T細胞白血病におけるHTLV-Iのようなレトロウイルス感染との関連と共に、これらの上述のヒト癌と疾病の発病における誘導因子として作用する感染性ウイルスの可能性のある役目を主張している。

感染性のウイルスがそれらの癌遺伝性を発揮する機構は、宿主細胞のDNAとのDNA組換えにより仲介されるであろうと信じられている。哺乳動物のゲノムは、プロトオンコジーンと命名されているある種の遺伝子を包含し、この遺伝子は急激に形質転換するレトロウイルスをゲノム中へ導入して癌原性を獲得することができる。(Bishop, Ann. Rev. Biochem. 1983, 52:301; Bishop, Cell 1985, 42:23)。ある種のヒト癌 (例えば、T24とEJヒト膀胱癌) では、同定した形質転換遺伝子 (H-ras-1 部位) がハーベイ・ネズミ肉腫ウイルスのv-rasHに関連していることが文献によく述べられている。プロトオンコジーンとオンコジーンの中ではras類は、ヒト腫瘍における活性化と発現の点に関して十分に特定されそして検討されている。プロトオンコジーンが、点変異 (例えば、c-rasH) または転移 (例えば、n-myc) をすると、そのような変化は、分化と成長における細胞調節を失わしめることができ、そしてその結果、癌発生になることができる。最近、ヒト (マールブ (Mahlavu)) 肝

細胞癌からの形質転換DNA配列、hhc^Mが同定され、大型断片の部分として分子的にクローンされた（ヤング他、J. Gen. Virol. 1982, 63:25; Yang et al, Environmental Health Perspectives 1985, 62:231）。

若干数の他のヒト肝細胞癌からのhhc^Mに関連したDNAクローンの多数が単離され、NIH/3T3細胞を零ないし中程度に細胞形質転換することが示されている。2種類は部分的に特定されていて、それらは、マールブ（Mahlavu）肝細胞癌から中程度の形質転換する遺伝子（hhc^M）と細胞を形質転換する活性を持たない正常ヒト肝臓DNAから単離した想定上の細胞性の同族（c-hhc）である。

hhc^Mとコーリヤンhhc^{K3}とc-hhcの2種の分子クローンの生物活性が特定され、そして比較された（ヤング他、Leukemia 1988, 2（12増補）:102S）。

2種の中国起源、1種のアフリカ起源そして17種の韓国起源からの肝臓のいろいろのゲノムのDNAにおけるhhc^M配列を増幅して観察し、そしてhhc^Mの可能な役目を明瞭にするために同じ肝臓中に組み込まれているHBV DNA配列の分布と比較した。

本発明は、肝細胞癌に特異的な癌タンパク質に、そしてそのようなタンパク質をコードしているヌクレオチド配列に関する。本発明は、該癌タンパク質（または同じものに特異的な抗体）と該ヌクレオチド配列を使用する診断方法そしてスクリーニング方法（そしてそれに基づいたキット）に関する。

発明の概要

本発明の目的の一つは、肝細胞癌タンパク質とそのタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を提供することである。

本発明の他の目的は、肝細胞癌並びに肝臓の癌発生前のまたは異常の状態の存在のための診断的試験を提供することである。

本発明の別の目的と利点は、下記の記述から当業者に明瞭になるであろう。

一つの実施態様では、本発明は、図1に示したアミノ酸配列とその対立配列、またはその配列の独特の部分にコードしているDNA断片にも関する。

他の実施態様では、本発明は、

- i) ベクター、および
- ii) 上述のDNA断片

からなる組換えDNA分子に関する。

他の実施態様では、本発明は上述の組換えDNA分子で形質転換した宿主細胞に関する。

他の実施態様では、本発明は上述のDNA断片にハイブリッド形成するための、そのDNA断片に十分に相補的なヌクレオチド断片に関する。

別の実施態様では、本発明は図1に示したアミノ酸配列またはその配列の対立変形、またはその配列の独特部分を持つタンパク質に関する。

他の実施態様では、本発明は上述のタンパク質に特異的な抗体（ポリクローナルおよび／またはモノクローナル）に関する。

別の実施態様では、本発明は上述の組換えDNA分子で形質転換した宿主細胞を、そのDNA断片が発現されそしてその際、そのタンパク質が生産されるような条件下で培養し；そしてそのタンパク質を単離することからなる方法に関する。

別の実施態様では、本発明は、

- 10 i) そのタンパク質への抗体の結合が起こり得て、その際複合体が形成されるような条件下で、そのタンパク質に特異的な抗体を試料と接触せしめ；そして
- ii) 複合体の存在を検定することからなる、試料中の上述のタンパク質の存在を検出するための方法に関する。

別の実施例では、

- i) その試料をそのヌクレオチド配列に、ハイブリッド形成が起こり得て、その際複合体が形成されるような条件下で十分に相補的であるヌクレオチド断片をそのヌクレオチド配列とハイブリッド形成させるために接触せしめ、そして
- 20 ii) その複合体の存在を検定することからなる、上述のタンパク質をコードしているヌクレオチド配列の試料中の存在を検出するための方法に関する。

別の実施態様では、本発明は、

- i) その試料中に存在しているタンパク質への抗体の結合が起こり得て、その際複合体が形成されるような条件下で、患者からの生物学的試料を上述の抗体と接触させ；そして
- 30 ii) 複合体の存在を検定することからなる、患者中の肝細胞癌の存在を診断する方法に関する。

別の実施態様では、本発明は、

- i) ハイブリッド形成が起こり得て、その際複合体が形成されるような条件下で、上述のヌクレオチド断片に、患者からの細胞試料から誘導された核酸配列を接触させ；そして
- 40 ii) その複合体の存在を検定することからなる、患者中の肝細胞癌の存在を診断するための方法に関する。

他の実施態様では、本発明は、試料中の上述のタンパク質の存在を検出するための診断キットであって、その容器中に配置したタンパク質に特異的な抗体を備えている容器からなるキットに関する。

- 50 別の実施態様では、本発明は、図1に示したアミノ酸配列またはその配列の対立変形、またはそれらの独特の部分を持つタンパク質をコードしている核酸配列の存在を検出するための診断キットであって、その容器中に上述のヌクレオチド断片を配置してある容器からなるキッ

トに関する。

図面の簡単な説明

図1は、hhc^Mの完全なヌクレオチド配列、およびその読み取り枠内にコードしてある52,000ドルトンタンパク質のアミノ酸配列を示している。

図2は、hhc^M52kDタンパク質の生産のためのhhc^M-LacZキメラプラスミドの構造を示してある。

図3は、ヒト肝細胞癌（マラーブ（Mahlavu））、ヒト正常肝臓からおよびネズミ（NIH/3T3）繊維芽細胞から調製した高分子量のDNAに結合しているアフマトキシニンB₁エポキシドを示している。

図4は、マキサム-ギルバート配列解析法の変法により、hhc^M（PM-1）DNA内でAFB₁エポキシドにより結合したdGの同定を示している。ヌクレオチドの配列はその側に特定してある。左側のパネルは、全ての4種の6デオキシヌクレオチドとAFB₁-dGのラダーを示している；右側の全ての他3種類には、本来のdGとAFB₁-dGだけを示した。aG=AFB₁はdGに常に結合した；⁰G=AFB₁と反応しなかったdGであり；一方、oG=中程度に好ましいdGである。

図5は、pJZ102を持つE. coli細胞におけるタンパク質生産の反応速度論的解析を示している。プラスミドpJZ102と対照のpJZ101を、細胞密度のクレット読みが80になるまで、E. coli細胞で培養した。その点で、誘導物質、IPTG（最終濃度、10⁻³モル）を添加してキメラ-hhc^M-lac52-kDタンパク質の生産のためのlacプロモーターからの翻訳を活性化した。特定の時間に培養物の1ml試料を取り出し、遠心によりペレット化しそして加水分解し、そしてタンパク質をラエムリ緩衝液中の煮沸により変性した。各々の試料の同量液を使用して下記文献に記載してあるようにしてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した（Sommerville他、「代謝調節の構造的小および組織的観点」（Structural and Organizational Aspects of Metabolic Regulation）:UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, New Series, 133巻, 181-197頁。ニューヨーク：アラン R. リス，社。1990）。

各レーンは下記のように表す：

- (a) pJZ102+IPTG 経過時間零における；
- pJZ102-IPTG 経過時間 零 (b)、および20時間 (c) における；
- pJZ102+IPTG 経過時間30分 (d)、4時間 (e)、7時間 (f)、および20時間 (g) における。

pJZ102形質転換E. coli細胞+IPTGの暗視野顕微鏡 経過時間 零 (a')、30分 (b')、4時間 (e')、7時間 (f')、および20時間 (g') における。前染色した分子量マーカー (m) kD単位は、130（最上端の弱い帯）、94, 75, 50, 39, 27, 17。

図6Aと6Bは細菌中で生成した精製hhc^M融合タンパク質p52を示し（図6A）そしてポリクロナール抗-p52 IgG

の特異性（図6B）を示す。

図6Aは、細菌的に発現したp52のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を示す。キメラhhc^M-lac融合タンパク質の細菌的発現のための全ての条件は図5に記載して通りである。レーンc、dおよびeはIPTGにより誘導した、pJZ102を（変えた量で）持つE. coli細胞の全細胞抽出物を示し、そしてレーンfはネガティブ対照のpJZ101を持つE. coli細胞の全細胞抽出物を表す。レーンa（5μl）、b（15μl）およびc（1μl）は、ウサギを免疫化するのに使用したゲル精製したp52の異なる量を示している。レーンmは、75, 57, 50, 39, 27, 17kDの前染色した分子マーカーを示している。

図6Bは、ポリクロナール抗-p52の反応性を示している。抗-p52ポリクロナールIgGはウサギを免疫化することにより生成する。0.8ないし1.0mg各々におけるSDSポリアクリルアミドゲル精製したp52は、標準的技術によりニュージーランド白ウサギを免疫化するのに使用した。2回投入の注射をした。

マラーブ（Mahlavu）肝細胞癌、Hp3p21.7およびHPG 2、およびpB⁺pM-1でトランスフェクションしたBRL-1腫瘍細胞と対照BRL-1細胞およびp52を各々10μlで包含する包装したヒト肝癌細胞（1/3:v/v）に該当する、洗浄剤（0.2% SDS）で加水分解した試料は、試料穴に入れ、そして拡散せしめそしてポリクロナール抗-p52 IgGに対して一夜交叉反応させる。48時間で結果を記録した。

図7は、³²P-hhc^MDNAに対するDNA-DNAハイブリッド形成を示す。

本発明の詳細な説明

本発明は、肝細胞癌の形質転換するヌクレオチド配列によりコードされている癌タンパク質にそして形質転換する配列そのものに関する。なお、請求の範囲に記載のアレル変異体とは、同種由来の同一遺伝子座を占める遺伝子で、その塩基配列に固体差レベルの変異を有するものを意味する。本発明は更にそのようなヌクレオチド配列の剤を検出するためのプローブとして使用するため、上述のヌクレオチド配列（断片）に十分に相補的なヌクレオチドセグメントに関する。本発明は更に温血動物中の肝細胞癌の存在を（並びに肝臓の癌発生前または異常の状態）検出するために使用するための診断およびスクリーニング方法に関する。

本発明の癌タンパク質は、肝癌に特に関連する肝癌細胞の増幅遺伝子発現生成物である。そのタンパク質は図1に示した完全な配列を持つことができ、その場合それはhhc^Mと命名される。そのタンパク質は、図1に示してある分子と実質的に同じ（例えば免疫学的に）性質を持つ分子のアミノ酸配列（例えば、図1の配列の対立型）も持つことができる。あるいは、本発明のタンパク質（またはポリペプチド）は、図1に示した配列の独特の部分に該当するアミノ酸配列（またはその対立型）を持

つことができる。

本発明のタンパク質は、実質的に純粋な形で、換言すれば、肝臓中に普通は同伴するタンパク質または核酸の実質的にない形で存在できる。

本発明の癌タンパク質は、これは該当するmRNAを使用して細胞のない抽出物中で製造できるタンパク質そして組換え技術を使用して製造される癌タンパク質を包含するが、当業技術でよく知られているプロトコールを使用して精製できる。一種のタンパク質、またはその独特の部分、当業技術でよく知られているプロトコールで、抗原に対する抗体、そのモノクローナルおよびポリクローナルの両方を生産するために、その抗原として使用できる。

他の実施態様では、本発明は、上述したように、図1に示したその完全なアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列（断片）（図1に示した特定のアミノ酸配列はただ一例のみである）（cDNA配列を包含する。）、またはその何れかの独特の部分に関する。

本発明が関与するヌクレオチド配列は、hhc^Mポリペプチドと実質的に同じ性質（例えば、免疫学的）を持つタンパク質（またはポリペプチド）（例えば、図1のアミノ酸配列の対立型）をコードしているそれらを包含する。

本発明は更に、上述のヌクレオチド配列と（例えば、ストリンジェント（stringent）条件下で）ハイブリッド形成するために上述のヌクレオチド配列に対して十分に相補的であるヌクレオチドセグメントに関する。

別の実施態様では、ベクターと上述したとおりのヌクレオチド配列（断片）を含有する組換え分子に関する（図1に示した分子またはその性質を持つ分子をコードしているDNA配列が有利である。）。ベクターは、ウイルスのまたはプラスミドベクターの型をとれる。そのヌクレオチド配列はそのベクターの中に、例えば、プロモーター（LacZプロモーター）を含有する通常の要素に作動できるように結合して含有されている。組換え分子は、原核または真核細胞を形質転換するのに適当であつてよく、プロセアーゼのないE. coli細胞が有利である。

本発明の組換え分子の特定例は、図2に示してある。この例では、hcc^Mヌクレオチド配列は、hcc^Mp52kDの元のN-末端18アミノ酸のコードを原核のLacZ発現／翻訳配列＋11アミノ酸のためのコードで、適当な組換え手順により入れ替えることによりキメラ構造中に置く〔ヤング他, Proc. of the XIV Inter. Symp. International Association for Comparative Research Leukemia and Related Diseasesによる協賛、1989年11月（ヴェイル、コロラド）〕。

LacZプロモーターの作動により、得られたキメラ遺伝子は、30℃でプロテアーゼ欠損E. coli変異体中で高いレベルで発現される。別の実施態様では、本発明は上述の組換え分子で形質転換した宿主細胞に関する。宿主は、

原核（例えば、細菌性（E. coliが有利である。）、低級真核（例えば、カビ（酵母を含む。）、高級真核（例えば、哺乳動物（ヒトを含む。））であつてよい。形質転換は当業技術で知られている方法を使用して実施できる。形質転換した宿主細胞は、上述のヌクレオチド配列（この配列は組換え分子の部分構成する。）のための源泉としても使用できる。組換え分子が発現系の型を取ると（上述の特定の構造を参照）、形質転換した細胞は癌タンパク質のための源泉として使用できる。

本発明の癌タンパク質と核酸配列は、研究設定において（例えば、どのようにそして何故に癌が増殖するのかの理解を容易にするために）そして肝細胞癌（並びに肝臓の癌発生前のまたは異常状態）の存在および／または肝細胞癌の発達の診断への臨床設定における両方で使用できる。

上述の診断またはスクリーニングの方法は、本発明の癌タンパク質（またはその特異的部分）に対する（既知の技術を使用して生産した）抗血清またはモノクローナル抗体を使用して実施できる。例えば、診断法は免疫学的検定の形で行なうことができ、それは肝細胞癌（例えば、慢性肝炎キャリアー）の危険度の高い患者のおよび／または肝臓癌が地理学的に同定されている問題地域（例えば、中国のチツング省（Chitung Province））の住民の尿または血清試料を使用して行なうことができる。

免疫学的スクリーニングは、簡便なステッキ浸漬型（dip-stick type）であつてよく、この場合、ステッキに付けてある抗原／抗体対の一方が、試料の中に存在する対のもう一方と結合すると色の変化が起きる（そのステッキ浸漬型検定は、多数の結合対の使用について記載されている。）。そのような簡便な試験法は、電気泳動分析装置（患者の血清中のα-フェトタンパク質レベルの検出に必要とされ、そのレベルは肝細胞癌の存在のスクリーニングと診断に最近使用されている。）が容易に入手できない地域の住民に広く利用できるだろう。

本発明の診断法は、本発明のタンパク質またはポリペプチドに対する抗体の使用を含む組織化学的診断試験の形をとることもできる。そのような試験は、凍結したまたは前固定した肝臓の薄い切片試料上で、肝臓癌のより明確に限定した診断を可能にする場合に使用できる。

本発明の診断法は、核酸配列の一部にハイブリッド形成するために十分に相補的である核酸プローブの使用をも包含する。そのようなプローブは、内因性の配列を検出するために、例えば、適当な制限酵素で消化したゲノムのDNAの電気泳動によって検出するためにも使用できる。プローブは、検出を容易にするために、例えば³²Pで標識化できる。

本発明は、更に、上述の方法を実施するのに使用するための診断／スクリーニング・キットにも関する。そのキットは例えば、本発明の癌タンパク質（またはポリペ

10

20

30

40

50

ブチド)に特異的である上述の抗体または、それとは別に、上述の核酸プローブから、試験を実施するのに必要ないずれもの助剤(例えば、緩衝液、検出マーカー、酵素基質、等々)と共になる。

本発明を、下記の限定を意図していない実施例で更に詳細に記述する。

実施例

下記の実施例で、下記のプロトコールを参考に行っている:

hhc^Mの分子クローニング

下記に記載したような、ヒト正常肝臓と(アフリカの)マラブ(Mahlavu)肝細胞癌(HHC)から精製したゲノムDNAを、制限エンドヌクレアーゼHind IIIにより完全に消化した。(BamH I, EcoR IおよびPst Iを包含する他の制限エンドヌクレアーゼも、HHC・DNA配列をクローニングするための試みにおいて、HHCと肝臓DNAからゲノムのDNA断片を単離するために使用した;これらの試みから単離したクローンはトランスフェクション検討に関しては成功しなかった。)[³H]アフラトキシンB₁(AFB₁)-エポキシド結合した(下記した)そして結合しなかった両方のDNA試料を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により180のフラクションに分離した。DNA μg当りの[³H]AFB₁-エポキシドの特異性を測定した。

下記したように、有意な[³H]AFB₁-エポキシドの特異性を持つフラクションをNIH3T3細胞上のDNAトランスフェクション検定に使用した。陽性の細胞形質転換を示す陽性のフォーカス形成を示すフラクションを同定し、そしてそれと平行の結合していないDNAフラクションを、他で記載したE. coli Hb101細胞の形質転換のために、pBR322, pBR325および/またはPuc8プラスミドDNAのHind III部位上のリゲーションにより、分子的にクローニングした(ヤング他, J. Gen. Virol. 1982, 63:25)。

かくして得られたクローンの第1番目の選択は、下記の項目に基づいた:

(1) テトラサイクリンに対する感受性、および/またはプラスミドのB-ガラクトシダーゼをコードしている配列を含むlacZオペロンの破壊に伴う色調の変化;および

(2) AFB₁結合の有るまたは無いNIH3T3上のトランスフェクション検定における細胞形質転換の能力;

(3) ヒトAlu配列(ローン他, Cell 1978, 15:1157)から調製した[³²P]プローブと[³²P]標識した、Hind IIIで消化したMAH HHC DNA断片に対するコロニーハイブリッド形成とDNA-DNAハイブリッド形成におけるヒト配列の存在;および

(4) DNA断片上の[³H]AFB₁-エポキシド結合。

[³H]AFB₁結合、NIH3T3細胞上のトランスフェクション検定および[³²P]Aluと[³²P]Hind III MAH HHC DNAプローブに対するDNA-DNAハイブリッド形成を含むこれらの4重の技術的アプローチによる30,000クローン

に及ぶスクリーニングの結果、3個のクローンを単離した。特にそのうちの1個の3.1kb DNA制限断片はhhc^MDNAを構成する。

プラスミドDNAとAFB₁結合の調製

これらの研究において使用されたクローンは、PM-1として引用される。プラスミドDNAはホルムスの方法、換言すれば、迅速加熱法である、20時間にわたる180,000xgにおけるCsCl₂-エチジウムブロミド・イソピクニック(isopycnic)遠心分離により行なわれる方法によって調製される(マニアチス他, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, ニューヨーク1982)。次いで、帯状になったPM-1 DNAからイソプロパノール抽出とTEN緩衝液に対する大量の透析によりエチジウムブロミドを除いて精製する。培地5ml当り25ないし50 μgの全プラスミドDNAが概して得られる。PM-1 DNAを、Hind IIIエンドヌクレアーゼで切断し、次いでアガロースゲル電気泳動と分離した3.1kb帯の電気抽出に処することにより、3.1kb・hhc^MDNAをPUC8 DNAと他の不純物から分離した。得られた3.1kb・hhc^Mは均一に精製されておりそしてAFB₁活性化実験に使用した。

hhc^M・3.1kb・DNAは、pSVneoベクター中にもクローニングされ、そのベクターはネズミのレトロウイルス(モロニー(Maloney))LTR、SV40プロモーターおよびネオマイシン抵抗性遺伝子の他にT抗原の部分を持つ。このクローン、rpMpN-1は細胞中にトランスフェクションされたとき顕著により高いレベルで発現され、トランスフェクション検定には特に有利である。15Ci/ミリモルの特異性における[³H]AFB₁はモラレス・ラボラトリー(Morales Laboratory)から得た。これをHPLCにより精製して均一にしそして得られた[³H]AFB₁の単一のピークが9,250cpm/pモル3の特異活性をもっていた。

それを、肝臓ミクロゾーム調製物から新規に調製した混合機能オキシダーゼを使用してまたは以前に記述したクロロ過安息香酸と塩化メチレンを使用する化学的過酸化反応によるかのいずれかで活性化反応に使用した(ベネット他, Cancer Res. 1981, 41:650; ガーナー他., Chem. Biol. Interact. 1979, 26:57)。

[³H]AFB₁エポキシドの、高分子量のHHCまたはプラスミドDNAとの結合を、反応速度論的解析により追跡した(ヤング他, Environmental Health Perspective 1985, 62:231およびモダリとヤング, Monitoring of Occupational Genotoxins pp. 147-158 (1986))。各々の時間点で取り出した試料を、クロロホルムで洗浄して未結合の[³H]AFB₁エポキシドを取り除き、[³H]AFB₁-DNAを、トランスフェクション検定または配列解析のためにTris-EDTA-NaCl (TEN) 緩衝液に再溶解する前に、エタノール沈澱した。

細胞培養と組織培養およびトランスフェクション検定トランスフェクション検定のための、継代培養6ない

し11回のNIH/3T3細胞、およびバツファロー・ネズミ肝臓細胞(BRL-1)を、5%CO₂雰囲気下37℃で、10%の熱で不活性化した雄子牛血清、ペニシリン(50単位m^l⁻¹)およびストレプトマイシン(25μgm^l⁻¹)(DHDM)で補ったズルベッコス変形イーグル培地中、保持した。

DNAトランスフェクションは、以前に記述したとおりに実施した(ヤング他, 1985とモダリとヤング, 1986年, 上記を参照)。最適条件を、DNA-カルシウムリン酸塩複塩混合物のためのpH曲線を注意深く滴定することにより実施した:pH6.75は細かい複塩の沈澱形成を保證することが通常見出されている。

組織培養細胞と腫瘍細胞からのDNAとRNAの調製

他で記述したように、全高分子量(HMW)DNAを組織培養細胞と腫瘍細胞から抽出しそして精製した(ヤング他, 1985, 上で引用)。かくして精製したHMW・DNAを、プロテナーゼKの消化、次にフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール、エーテルおよびエタノール-NaCl沈澱による最初の連続的な化学的精製、それに次ぐリボヌクレアーゼ消化そして2番目の連続的な化学的精製に処した。そして、精製したDNAを実験で使用するためにTEN緩衝液に対して透析した。全RNAを組織培養細胞から抽出しそして前に記述したようにして調製した(マニアチス他, 1982, 上記を参照)。ポリ(A)豊富なRNAをオリゴdTセルロース(Collaborative Research, マサチューセッツ州)カラム抽出によるアフィニティ分離により得た。

腫瘍形成

形質転換した細胞(これは、クローニングシリダー法)(cloning cylinder method)または末端希釈法(terminal dilution method)のいずれかによりトランスフェクションした培養物からのクローン・アウト(clone out)したものである)を、希釈し、10⁴ないし10⁶の細胞を無胸腺症のスイスnu/nuマウスに皮下注射した。試験したマウス中の腫瘍形成を綿密に追跡した。

ヌクレオチド配列解析と部位標的変異誘発

hhc^M3.1kbと部位標的変異誘発(site-targeted mutagenesis)により生成した変異種のヌクレオチド配列解析は、マクサム-ギルパート法(Enzymology 1980, 65:499)およびサンガー(M13)ジデオキシ配列解析法(マニアチス他, 1982 上記で引用)により実施された。

標的とするdG→T変異を持つ20マー(20mers)の特定したオリゴヌクレオチド配列は、アプライドバイオシステム(Applied Biosystem)オリゴヌクレオチド

合成器で合成した。それらは変異したクローンの誘発における鋳型として使用される。変異体のDNAクローンは、アメルシャムの「オリゴヌクレオチド指向インヴィトロシステム(oligonucleotide-directed in vitro system)」(Arlington Hts., イリノイ州)を使用し、そのプロトコールに従って合成した。変異したクローンのDNAはヌクレオチド配列解析により確認した。これらの部位標的変異誘発したDNAの効果は、NIH/3T3細胞上のトランスフェクション検定における細胞-形質転換の強化とBRLドットプロット技術(Bethesda Research Laboratory, Rockville メリーランド州)を使用するトランスフェクションした細胞におけるRNA発現により解析した。

実施例 I

AFB₁結合の用量測定とNIH/3T3細胞上のhhc^M細胞形質転換能の強化

AFB₁エポキシドは、ヒト肝臓、ヒト肝臓およびマウスNIH/3T3細胞から調製した高分子量のDNAと効率よく結合する(図3)。各々の結合反応速度の初速度は極端に早い。ヒト正常肝臓または肝臓DNAに対するそしてネズミNIH/3T3細胞DNAに対するAFB₁-エポキシド結合は結合反応の1分後には顕著に異なる。MAH HHC DNAは、正常肝臓DNAより大きい結合速度を示したそして全てのdG標的はより速く飽和した。一方AFB₁エポキシドは正常肝臓DNAにより低い速度で結合したが、結果的には若干低いレベルで全てのdG標的を飽和した。ヒトのDNAは、ネズミNIH/3T3細胞DNAより高いレベルでのAFB₁結合を示した。AFB₁の全ての特異的活性、換言すればAFB₁-dG付加物は、これらの高分子量二本鎖DNAの間での10個のヌクレオチド当たり約1個の結合したdGが見出された。この全体的な特異性は、高分子量DNAの二次元的または三次元的な構造の存在も考慮にいられた。線状にした3.1kb二本鎖hhc^MDNA上に結合しているAFB₁エポキシドは10⁴ヌクレオチド当たり4ないし8個の結合したdGであることが一貫して見出された。このより高い結合能は、AFB₁エポキシドによる直鎖の二本鎖PM-1 DNA内のdGの比較的容易な接近性を反映しており、そして高分子量の天然の二本鎖DNAとのAFB₁-dG付加物形成の効率と比較すべきでない。

有限の用量測定の範囲内では表1に説明した実験に見られるように、dGとAFB₁エポキシドの結合は、hhc^Mの細胞-形質転換の能力を10ないし20倍強化する。

表1. NUB/3T3細胞の形質転換におけるPM-1
DNAのAFB₁薬量依存性活性化

DNA起源	100 ng AFB ₁ 当たり のAFBTB ₁ 7±1%	100 ng DNA 当たり のフォーカスの数	15 x 10 ⁻¹
hhc ^M (PM-1)	0	15	x 10 ⁻¹
C-Ha-ras-1	0	465	
c-K-ras-1	0	0	
c-hhc (ヒト肝臓の同族体)	0	0	
<u>B. coli</u>	0	0	
hhc ^M (PM-1)	0	15	x 10 ⁻¹
hhc ^M (PM-1)	5	18	
	14	26	
	24	66	
	35	3	
c-hhc	0	0	
	8	0	
	15	0	
	30	0	
	40	0	

(表1の説明)

AFB₁結合とトランスフェクション検定は方法に記載されているとおりであった。データは100ngを基準にして計算した。非結合のhhc^MDNAを使用する検定では、トラ

ンスフェクション検定はNIH/3T3細胞上の合理的フォーカス形成を得るために500ngないし1.5μgのDNAを使用した。AFB₁-エポキシド結合したDNAによるトランスフェクションは、50ないし500ngのDNAの範囲で実施した。

AFB₁-エポキシド活性化によるhhc^M細胞-トランスフェクション能力の相乗作用を示すように標準化した。

NIH/3T3細胞の形質転換における非結合PM-1 DNAの効率、通常約15FFU/ μ gDNAで観察されるのに対し、AFB₁エポキシド活性化したPM-1 DNAの効率は、66FFU/100ngDNAで最高になり、その増加は約20倍であった。この相乗作用のための非特異的な変異化の計数の可能性は考慮した。この相乗作用の効果は細胞中へ拡散した遊離AFB₁に因るかまたはAFB₁付加物の再循環に因るかということは、同じ用量測定での正常の肝臓またはE. coli DNAの活性化がいかなる細胞-形質転換能を活性化することができなかったということを示した適当な対照実験でもって、以前に除外した(ヤング他, 1985, 上記引例)。

更に、c-ras^k-1またはc-hhc(適当な対照としてのhhc^Mと同族の正常ヒト肝臓)からのAFB₁で活性化したDNAによるこの実験では、NIH/3T3細胞の細胞形質転換は得られず、そしてこのことはAFB₁エポキシドで活性化したPM-1 DNAは偶然の現象でないことを示している。

更に、細胞形質転換効率におけるPM-1 DNAのAFB₁薬量依存性(表1)は、形質転換の相乗作用を合わせ考慮するとAFB₁エポキシド結合の特異性を更に実証した。最適用量は(24フェムトモルのAFB₁)/(100ngのPM-1)で観察されるものの、(45以上フェムトモルのAFB₁)/(100ngのPM-1)の用量では、過剰効果が観察された。ヒトDNAが分解された形でNIH/3T3細胞中へ取り込まれたもののAFB₁エポキシドで結合したPM-1 DNAでトランスフェクションしたNIH/3T3細胞には形質転換したフォーカスは得られなかった(ヤング他, 1985およびモダリとヤング, 1986, 上記引例)。この観察は、PM-1 DNAの過剰の活性化は分子中の切断を発生するだけでなく生理的活性を喪失するに至らしめる分解の可能性もあることを暗示している。これらの結果からも、PM-1 DNA分子当たり1個だけまたは多くとも数個のAFB₁-dG付加物は、hhc^MDNAの生物学的活性が損傷を受ける前にそして生存をかけて、hhc^MDNAによって耐えられることが明瞭である。更に、形質転換におけるhhc^MDNAの相乗作用は、恐らく1個または多くともせいぜい有限数のAFB₁結合のみを必要とする。

実施例II

PM-1 DNAのdGのAFB₁-エポキシド結合の特異性

天然DNAのデオキシグアニンヌクレオチドは、AFB₁エポキシドと結合すると、アルカリ性になりそしてそのためピペリジン切断により確認できる; 一方、同じ天然のDNA中の非結合のデオキシグアニンはジメチルスルフィド(アルカリ性)処理なしでは切断しない。図4は、飽和条件で結合させられた場合のPM-1 DNA内のdG標的

を示している。標的配列をテトラヌクレオチドのセットで評価する場合、PM-1 DNA中のdGとのAFB₁エポキシドの結合パターンを基礎にして経験的公式を誘導できる。

表2は、AFB₁エポキシドにより見られそして標的とされるテトラヌクレオチドのセットにおけるヌクレオチドは配列を纏めたものである。図4に示したように、次のテトラヌクレオチド: AGAG, AGTT, TGTT, TGATまたはAGAAはAFB₁エポキシドによる攻撃を免れていた、事前のDM S処理なしには配列内の切断を示さなかった。これは、GGC, CGGC, AGGC, TGGCまたはCGCGCの配列内のdG上へのAFB₁エポキシドの攻撃の結果としてのdGの明瞭な切断により確定される。

dG標的がAFB₁エポキシドにより接近できるいろいろの配列を評価すると、二本鎖DNA内では標的に最もなりそうもないdGは、dAとdTに隣接しているそれであって、換言すればカテゴリーIIIのようである。

最も標的になりそうなdGは、dGおよび/またはdCに隣接しているそれであって、換言すればカテゴリーIのようであり; そしてdAまたはTにより先行され、そしてdGまたはdCにより後続されるそれはいずれもAFB₁エポキシドの中程度に好ましい標的であるらしく、換言すればカテゴリーIIのようである。これらの解析が直鎖二本鎖DNAについて行なわれたので、この考察は、勿論、その自然状態におけるDNAの二次元または三次元構造を考慮に入れていない。AFB₁-エポキシドのdG結合親和性は、二本鎖PM-1 DNAにおける隣接ヌクレオチドにより大きく影響されるものの、一本鎖DNA中のdGに対するAFB₁-エポキシド結合に就いては特異性は観察されなかったことも、述べるべきである。モダリとヤング(1986上記)の観察は、OX174とpBR 322DNA上へのAFB₁結合についての他の研究(ミラス他, Biochemistry, 1983, 22:3351)と基本的に一致していた。

過去2年の間に、hhc^Mのヌクレオチド配列はマクサム-ギルバート・ヌクレオチド配列解析法とBRLキロベース配列系を使用するM13ジデオキシ法の組み合わせにより解明されている。hhc^M3.1kbヌクレオチド配列のコンピュータ解析におけるこれらの経験則を利用して、hhc^Mのいろいろの遺伝子座内の最もそして中程度に好ましいdG標的を予測した。直鎖状にした3.1kbのhhc^MDNAでのAFB₁-エポキシド結合の研究を基礎にして最大数60個のdG標的を予測したものの、hhc^M配列の可能な二次元または三次元構造を考慮すると、かなりより少ない数のdG標的がAFB₁-エポキシドにより接近可能であることは明瞭である。更に、そのような誘発した変異の僅かだけが残存して何らかの効果をもたらすのであろう。

表2. 隣接するヌクレオチド配列が、A F B₁ -
エボキシド結合のd G標的を指令する

好ましい標的の カテゴリー I	最も好ましくない標的 カテゴリー III
★	★
GGGG	AGAG
GGGC	AGTG
GGGA	AGAA
GGGT	AGAC
CGGG	AGAT
AGGG	TGAG
TGGG	TGAC
CGGC	TGAA
AGGC	TGAC
TGGC	TGTG
CGGA	TGTA
AGGA	TGTC
TGGA	TGTT
CGGT	
AGGT	
TGGT	

★ この研究を
この表で示す
は、観察し
、観察し
直さる。一
鎖れた中
二本A程は
鎖F度こ
P Bにこ
M、好で
ー、まは
1 エし除
D キdし
N シGて
A ド標い
にの的る
つd G換
いG換
て標言別
の的すの
(1986)

表, 8. h h c^M のヌクレオチド配列内で A F B₁ - エボ
キシドにより好ましく攻撃される予測 d. G 標的

* CGCC	* CGGC	* GGCC	* GGGC	* GCGA	* AGGA	* TGCC	* TGCG	* TGGA	* TGGG	* GGAC
	* CGGC			* GCGA	* AGGA			* TGGA	* TGGG	
				73 74		84		97 98		
			125 126						140	
				223 224 307 308				221		
								371 391		
		472							481 492	
			494 495							
				539						
			560 561							550
		577		692						
				901 1125					860	
			1320 1321							
								1330		
								1354 1404		
1405										
			1431							
1543 1588										
								1637		
						1652				
		1765								
1853				1815						
				1862						
						1878				1868
				1986						

表 8 (続 き)

CGCC	CGGC	GGCC	GGGC	GGGA	AGGA	TGCC	TGCG	TGGA	TGGG	GGAC
	★			★	★			★	★	
	CGGC			GGGA	AGGA			TGGA	TGGG	
				2064						
				2094						
		2205								
			2352					2315		
			2352					2331		
									2460	
		2482						2718		
						2797		2884		
						2926				

このようなAFB₁で誘発したdG→T変異の何れかのあり得る影響を解析するために、hhc^MDNAの部位一標的変異誘発の研究は、恐らくAFB₁-エポキシド変異誘発の結果であるところの予測dG→T点変異を持つ20マーのポリヌクレオチドを使用して開始した。

今までのところ、予測したdG→T変異誘発部位の僅かだけが解析されそしてこれらが表4に纏められている。

SV40 T抗原ベクターの中にhhc^M配列に加えてネオマイシン抵抗性マーカー、rpN^rpM-1を持つ組換え構造がこの研究で使用された。というのは、この構造は、ネオマイシンの同族体であるゲンタマイシン (G418) に対するその抵抗性によりトランスフェクションした細胞の選択の便宜を提供するからである。hhc^Mに特異的なmRNAの発現をクリテリオン (criterion) として利用して、我々はmRNA、換言すれば変異したhhc^M配列でトランスフェクションした後G418に抵抗性のNIH/3T3細胞で発現したポリA豊富なRNAのセミ一定量的検定でノザン・ドットプロットにより解析した。これらの細胞におけるフォークル形質転換は4ないし6週間にわたり追跡した。

そのヌクレオチド配列が確定している7個の変異したクローンからの結果は、今までのところ、構造タンパク質の変更に招く変異はhhc^Mの細胞の形質転換を相乗しているようには見えなかった (表4)。また、別にはアミノ酸の置換を招いた誘発dG→T変異は、今までのところ、形質転換またはmRNAレベルの発現を変えたようには見えなかった。これらは、Gly→Valのアミノ酸置換の原因になった577における変異または「ゆらぎ (wobbling) コードのためにアミノ酸置換になっていない1005における変異を包含する。

hhc^Mヌクレオチド配列の間に、約467のアミノ酸のポリペプチドをコードしている明瞭な読み取り枠、ORFが存在する。これは、55-57kDタンパク質と、ウサギの網状赤血球リゼート (lysate) 系においてhhc^Mに特異的なmRNAを使用する無細胞タンパク質合成で観察される53kDを包含する若干数のより小さいポリペプチドと良く一致していた。

最初のメチオニンコドンの丁度前5' のリボゾームRNA結合部位のための共通配列を持っている5' 末端中73と74のヌクレオチドにおけるdG→Tの変異は、細胞形質転換をブロックするが、hhc^Mに特異的なmRNAレベルは変化を示さなかった。これはタンパク質合成をブロックした結果であると言える。同様に、ストップコドン (UGA) が各々の場合導入されてタンパク質合成を未成熟に停止したので、492と550における変異として説明したものも細胞形質転換をブロックした。

626におけるdG→T変異は、RNAポリメラーゼのためのエンハンサー配列に類似している配列を誘発することに注目することは興味があり、この配列はコードしている配列中でも機能すると報告されている (表4の脚注)。mRNAのレベルは1.5倍増加しそして細胞形質転換は、DNA μg 当りのフォーカスの数で僅かに増加している分増強されているように見える。

この観察は、それ自体が中程度にDNA配列を形質転換しているhhc^MにおいてAFB₁が誘発する変異がその形質転換の潜在能力を高める一つの可能な作用が、hhc^M発現の増強を介しているということを暗示している。これは他の観察と類似しており、その観察は、プロモーターとエンハンサー配列の両方を含んでいる、ネズミのLTR配列により作動される細胞性のrasプロトオンコジンの増

加した発現も、死滅し易くなっている組織培養細胞における細胞の形質転換を起こすことを示していた。

表4. $h h c^M$ DNA 配列内の部位標的変異誘発により誘発された $d G \rightarrow T$ 変異の影響

$h h c^M$ 上の #	配列	m R N A 合成	細胞形質転換
	*		1)
73	AGGA --> ATGA	+	-
	*		1)
74	AGGA --> AGTG	+	-
	*		2)
492	TGGG --> TGTG	+	-
	*		2)
550	GGAG --> GTAG	+	-
	*		
577	GGGC --> GTGC	+	+
	*		3)
626	GGGG --> GTGG	++	++
	*		
1005	TGCA --> TTCA	+	+

1) リボゾーム R N A (1 6 S) 結合部位 : AGGA の破壊

2) ストップコドン : $U G A^*$ の発生

3) エンハンサー配列 : $G G T G T G G T A A A G^*$ の発生

(ワトソン他., 1987; ダイナンとツジアン, 1985; シャフナー他, 1985) その結果発現を増加する。

細胞の形質転換は、方法で記述したとおりにトランスフェクション解析により測定し、トランスフェクションした細胞内における m R N A 合成は、 $[^{32}P]$ 3. 1 k b $h h c^M$ DNA のノザードットプロット解析により測定した。

実施例III

$h h c^M$ -p52 と抗-p52 とヒト肝細胞癌と関連する肝臓の前腫瘍病理学的状態のスクリーニングおよび診断試薬としての使用

融合タンパク質としての $h h c^M$ -p52 は、高いレベルで

上述の細菌系により製造された (図5)。このタンパク質は、関連するヒト肝癌タンパク質に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体の両方のパネルを創製するのに使用される (図6Aと6Bを参照)。

抗-p52, $h h c^M$ -p52 に対する多価の抗体は製造されそ

してアフリカ（マールブ（Mahlavu））肝癌とフィラデルフィア肝癌に対して高度に特異的であることが示された（図6Aと6B）。

腫瘍試料における肝癌の特異的なタンパク質 p-52 の存在のための検定は、抗-p52 と、放射性のまたは蛍光抗体の標識と共にまたはなしに、反応した腫瘍試料を使用する拡散と免疫沈澱を包含する。更に、放射性化合物または発色団の何れかで標識した抗-p52 は、血清または尿試料中の患者により出された肝癌関連のタンパク質の存在を試験するための、RIPA または色変化検定の各々において有用である。全身の灌流に適當である蛍光化合物または他の適當な化合物に接合した抗-p52 を使用する蛍光像解析は、走査により癌発生前のまたは癌の病巣それ自体の場所を局在化する能力を提供する。病巣の局在化は、外科的精度でもってレーザー除去をすること、および／または他の処理をすることを可能にする。

hbc^M-p52ヌクレオチド配列は、適当に標識化されると、生検試料における肝癌を診断するのに利用できる。

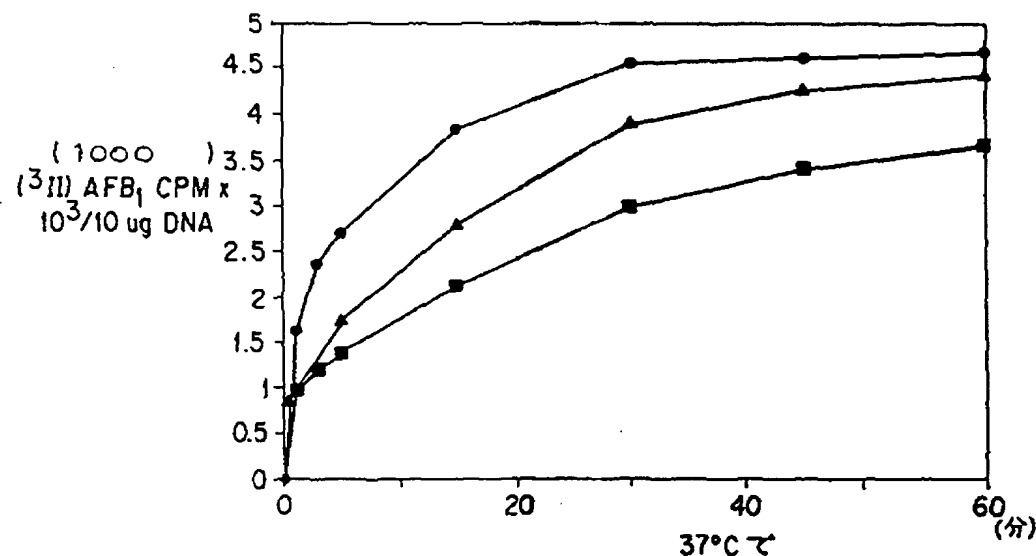
hhc^M－関連の核酸配列は発生前の癌小節または肝癌を持っていると疑われている患者の生検針試料中で検出できる。これは、hhc^M－p52配列の断片をプライマーとして使用して「hhc^M－様」配列を増幅するポリメラーゼ・チェーン反応を使用し、そしてDNA－DNAハイブリッド形成反応でプローブとして標識化したhhc^M－p52でもって生検試料中のそのようなhhc^M－様配列の存在を検出することにより実施される。そのような実施例を図7に示した。

10 * * * *

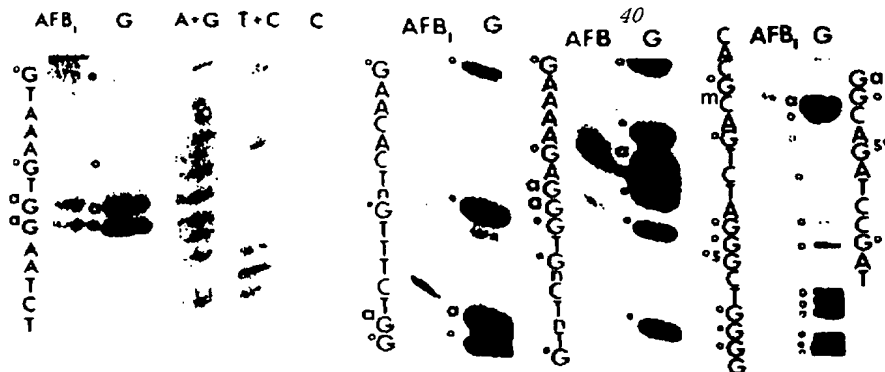
ここで引用した全ての引例文献中の全内容はここでは引例文献中に包含される。

本発明を、明瞭にしそして理解する目的のために若干詳細に記述した。当業者は、この開示を読むことから、形式と詳細におけるいろいろの変化は、本発明の真の範囲から乖離することなしに成され得ることを理解するであろう。

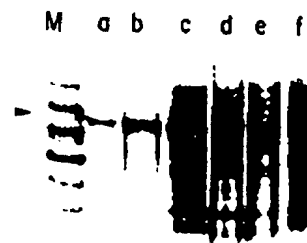
【第3図】



【第4図】



【第 6 A 図】



【第1図】

<p>81 AAG CTT AAT AGA AAA TAT GAG CAA CAT ACA CAA ACA TTA GCA ACA ATG ATA TAA AAT ACC ACT TAA ACA TAA GGA AAA ATG MET</p>	* 54	<p>108 TTG CCC TTC ACT TGT GGA AGA AAT GCA AAT GAA AAC AGC CCT AGG GAT GTT GAC GTT GGG GTG GCA CCT GCT GCA GAG GGT Leu Pro Phe Thr Cys Gly Arg Asn Ala Asn Glu Asn Ser Pro Arg Asp Val Asp Val Gly Val Ala Pro Ala Ala Glu Gly</p>	135	<p>189 AAC GTG CAG CAT GTC GAG GGC AGC ACT GCC AAG GCT GGT TTG AGC TCA AGG TCA GGT GGA GGA GGT AGT CTC TCC CAT CTC Asn Val Gln His Val Glu Gly Ser Thr Ala Lys Ala Gly Leu Ser Ser Arg Ser Gly Gly Gly Ser Leu Ser His Leu</p>	216	<p>270 TTC TGC GAG TGC AGC TCT AAA CCC TGC CTG AAA CAC CAC GTG GAG AAG CTA TCT GAG CTG CCT CCA GGA CAC ATG CAA ATG GAC Phe Cys Glu Cys Ser Ser Lys Pro Cys Leu Lys His Val Glu Lys Ser Glu Leu Pro Pro Gly His MET Gln MET Asp</p>	297	<p>351 ACT CTG ATC ATA AAA TTA TCA GGA AGA TTG AGA AAT AAG ACA AAA ATG GAG GTG CCA CCA AAC CAG TGG AAA TTT TTC CCC Thr Leu Ile Ile Lys Leu Ser Gly Arg Leu Arg Asn Lys Thr Lys MET Glu Val Pro Pro Asn Gln Trp Lys Phe Phe Pro</p>	378	<p>432 TTT TCA TTC CTC TGG CAT TCC CTG GCC TTG ACT CAA GGC AGC CCA CAC TCT AGG AGC AGA CAC CAG GGC ACA GGT GGG GAG Phe Ser Phe Leu Trp His Ser Leu Ala Leu Thr Gln Gly Ser Pro His Ser Arg Ser Arg His Gln Gly Thr Gly Gly Glu</p>	459	<p>513 CTC TGG GGG ACC CTC CAG GCT TAC TCA GTG AAT GGG TTA GCA GCA GCC ACA GGA GCC ACC ATG GAG CCT GCA GGG ACC CAC Leu Trp Gly Thr Leu Gln Ala Tyr Ser Val Asn Gly Leu Ala Ala Thr Gly Ala Thr MET Glu Pro Ala Gly Thr His</p>	540
---	------	--	-----	--	-----	--	-----	--	-----	--	-----	--	-----

594 621 648
 AAC ACT GAG GGC AGG GAT CTT GCC TCT AAT CAG ATA AGC TGT GAT TCC CGA GAG GGT GGG GTA AAG GCC ACG GGT CTT TTT
 Asn Thr Glu Gly Arg Asp Leu Ala Ser Asn Gln Ile Ser Cys Asp Ser Arg Glu Gly Gly Val Lys Ala Thr Gly Leu Phe

675 702 729
 CTC TCC ACA TCT TCC CAC GTC ATG ACC CCA GAG GGT CGA AGA GGG AGA AAG TGT GAG CAC CGT GAC ATA ATG AGC CGC AGC
 Leu Ser Thr Ser Ser His Val MET Thr Pro Glu Gly Arg Arg Gly Lys Cys Glu His Arg Asp Ile MET Ser Arg Ser

756 783 810
 CTT CTG ACT AGA TGC CCC AAA GAA GAA TCC CAG GTG ACC ACA CAG CAT CAG AGA AAC TGC AGG GTA ATG AGG AAC TTT GGA
 Leu Leu Thr Arg Cys Pro Lys Glu Glu Ser Lys Gln Thr Thr Gln His Gln Arg Asn Cys Arg Val MET Arg Asn Phe Gly

837 864 891
 AAG CAA TCC ATC GTG TTG TCA GTA AAA CCT CTG GCT CAC TCC CGA GCT GGG CAT GCA TGG ATG GTG ACC CTC GAT GGA ATA
 Lys Gln Ser Ile Val Leu Ser Val Lys Pro Leu Ala His Ser Arg Ala Gly His Ala Trp MET Val Thr Leu Asp Gly Ile

918 947 974
 GAC TAT GAG GAA CCA GGT GAG GGG ATC TAC CTC CAC CGA GAC GTG AGA GTG ACC TGC ATA CCC AAA CAC CAT GAG GCT TTA
 Asp Tyr Glu Glu Pro Gly Glu Gly Ile Tyr Leu His Arg Asp Val Arg Val Thr Cys Ile Pro Lys His His Glu Ala Leu

999 1029 1053
 AAG ACT GAG CTG ATG TGG AAG CCA CAG CCT CTG CAG GGT GCT CTG CAC TTG CAA CAT AAG CCC AAC CAC ATC AAT TGC TGC
 Lys Thr Glu Leu MET Trp Lys Pro Gln Pro Leu Gln Val Ala Leu His Leu Gln His Lys Pro Asn His Ile Asn Cys Cys

1080 1107 1134
 AAA ACA AAA CTA CAG CAT TCT CCA TAC CAC TTA AAT AAG ACA CAG AGT CTC ACA ACA TTC AAA ACG CCC AGG ACA CAA TCC
 Lys Thr Lys Lys Leu Gln His Ser Pro Tyr His Leu Asn Lys Thr Gln Ser Leu Thr Thr Phe Lys Thr Pro Arg Thr Gln Ser

1161 AAA ATT ACT TCT ACA AAA AAT CAG GAA AAT CTC AAT GAG CAA GGA AAA TGG CAA TCA GTA GCT GCC AGT GCT GAG ATG ACA
 Lys Ile Thr Ser Thr Lys Asn Gln Glu Asn Gln Glu Asn Gln Ser Val Ala Ala Ser Ala Glu MET Thr 1215
 1188
 1248 ATG AGG GTT GGA ATC ATC AAC ATC TTT AAA GTA ATT ATC ATA AGC ATT CTC CAG CAA GTA ATG GCA AAC ACT CTT GAG ATA
 MET Arg Val Gly Ile Ile Asn Ile Phe Lys Val Ile Ile Ser Ile Leu Glu Gln Val MET Ala Asn Thr Leu Glu Ile 1270 1296
 1323 AAT GGA AAG ATA AGA AGG CTC AGG GAG AAA GTG GAA TGT ACA AAG AAT GAC CAA GTG GGA ATT GCA CCA CTG GAA ACA AAT
 Asn Gly Lys Ile Arg Arg Leu Arg Glu Lys Val Glu Cys Thr Lys Asn Asp Gln Val Gly Ile Ala Pro Leu Glu Thr Asn 1350 1377
 1404 CAC CAG GAT AAA GCA GTC TCT GGC TGG GCC AAC AGG AGA ATG GAA ATG AAA AGG GAA AGA GTT GTT ATG GCA GTT GTC CAA
 His Gln Asp Lys Lys Ala Val Ser Gly Trp Ala Asn Arg Arg MET Glu MET Lys Arg Glu Arg Val Val MET Ala Val Val Gln 1431 1458
 1485 TTT GAA CAA CAC AAA AGA CAC TGA TTT AAA AAA AAA TGA GGC AGG GCT CAG TGG CTC ACA CCT ATA ATC CCA ATA CCT TGG
 Phe Glu Gln His Lys Arg His 1512 * 1539
 1566 GAG GCC GAG GCA ATG TAT CAC CTG AGG TCA GGA GTT CAA GAC TAC CCT GGC CAA CAT GGC AAA ATC CCA TCT CTA CTG AAA
 MET Tyr His Leu Arg Ser Gly Val Gln Asp Tyr Pro Gly Gln His Gly Lys Ile Pro Ser Leu Leu Lys 1593 1620
 1647 ATA CAA GAA TTA GCT GGG CAT GGT GGC AGG TGC CTG CAA TCC CAG CTA CTC AGG AGG CTG AGG CAG AAT CAC TTG AAC
 Ile Gln Glu Leu Ala Gly His Gly Arg Cys Leu Gln Ser Gln Leu Leu Arg Arg Gln Arg Gln Glu Asn His Leu Asn 1674 1701

1728 TCG GGA GGT AGA GGG TGC AGT GAG CCA AAA TCG CAC CTC TGC ATT CCA GCC TGG GTG ACA GAG GGA GAC TCT GTC TCA AAA
 Ser Gly Gly Arg Gly Cys Ser Glu Pro Lys Ser His Leu Cys Ile Pro Ala Trp Val Thr Glu Gly Asp Ser Val Ser Lys 1782

1809 CAA AAC AAA ACA AAA AAT GAA CAG CAC CTC AGG AAC AAT ACC AAA AAG TCC AAC AGC TGT ATA ATT GGT GGC CCA GAA GGA
 Gln Asn Lys Thr Lys Asn Glu Gln His Leu Arg Asn Thr Lys Lys Ser Asn Ser Cys Ile Ile Gly Gly Pro Glu Gly 1863

1890 GAG GAG AAA GAG TGG AGT ACA GAA ATG AGA TCT GAA GAA CTA ATG ACT GAT AAT GTT TCA ATT TTG AAA AAG GAC ATA AAC
 Glu Glu Lys Lys Glu Trp Ser Thr Glu MET Arg Ser Glu Glu Leu MET Thr Asp Asn Val Ser Ile Leu Lys Lys Asp Ile Asn 1944

1971 CTA AAG ATT ATA GAT TCA AAA GCC CAG CTG AAT TCA AAT AGG ATA AAT ACA GAT GCA GAT ATA TTA TCA TTA AAC TGT GAA
 Leu Lys Ile Ile Asp Ser Lys Lys Ala Gln Leu Asn Ser Asn Arg Ile Asn Thr Asp Ala Asp Ile Leu Ser Leu Asn Cys Glu 2024

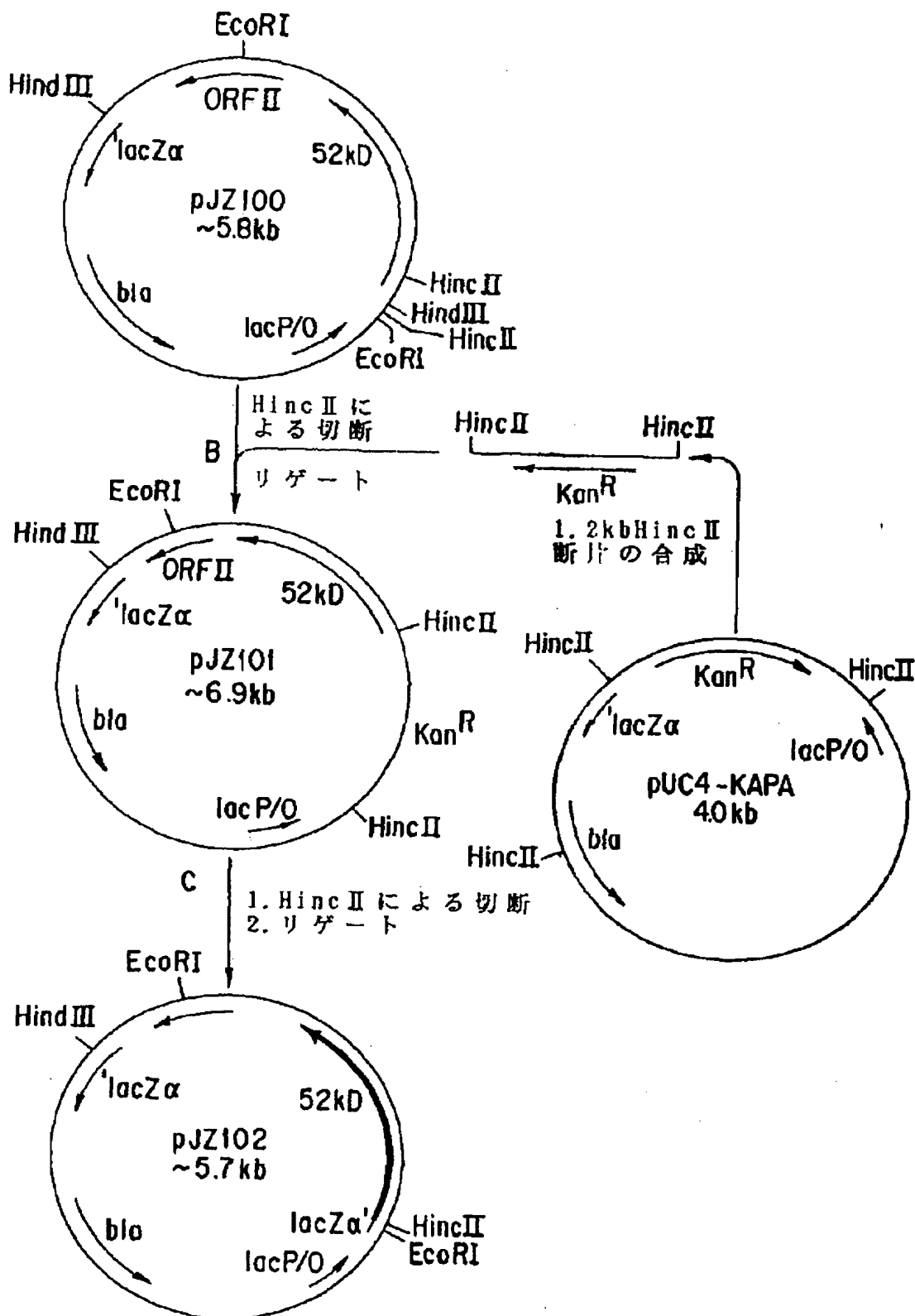
2052 ATA AAT TGG TTT TGT CAC AAG CCA GCA TTG TCA CTG TGG GAG AAA AGA GAT CAA AAG TAC ACA AGG AAG GAA GGA AAT ACA
 Ile Asn Trp Phe Cys His Lys Lys Pro Ala Leu Ser Leu Trp Glu Lys Arg Asp Gln Lys Tyr Thr Arg Lys Glu Gly Asn Thr 2106

2133 GAA TAT TAT GGC CAT GGG AAA GAG GTG TCA GTG TGA ATA CAT AGA ACA GCA CAC TTA AGC AAC AAC CCC AAA TGA TGG GGC
 Glu Tyr Tyr Gly His Gly Lys Glu Val Ser Val • Ile His Arg Thr Ala His Leu Ser Asn Asn Pro Lys • Trp Gly 2187

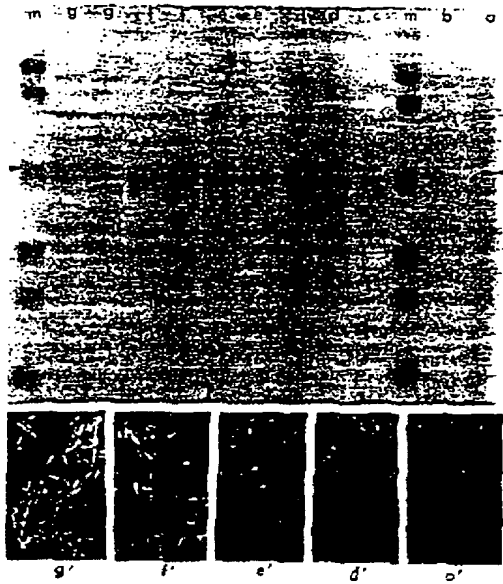
2214 TTC CTA CAA AAC AGT TGG CCT TTA CTC TTC AAA AGT GTC AGG TCA CGA AAT AAA TCC ATG CTG AGG ACC CGT TCC AGG TTA
 Phe Leu Gln Asn Ser Trp Pro Leu Leu Phe Lys Ser Val Arg Ser Arg Asn Lys Ser MET Leu Arg Thr Arg Ser Arg Leu 2268

2295	AAG CAG ACT AAA GGG GCT GGA CAA CAC AGT GAA ACG TGT GAG CTT GGA TTA GAT ATA TGC TGG ACT AGA GAA GGC TGT GAG	2322	2349
	Lys Gln Thr Lys Lys Gly Ala Gly Gln Pro Ser Glu Thr Cys Glu Leu Gly Asp		
2376	GGG GAC AAT GGC TGA AAT GTG AAT GAG GTT ACT ATA GTT ATG AAA AAT GTT AAG ACT TGG AAA ATC TAT ATA AAG CAG ACG	2457	2484
2511	GCA TAA TTC TTG TAC TTT TTT TGC AAC TTT TTA ATA AAC CTG AAA CTA TTT CAA AAT GAA AAG TTA ATC CAA GCT GTC TTG	2538	2565
2592	AGT AGA AGT TAA AAC AAC AAC AAA AGA AAA TTG AAA AGT TAA AAA TGA ACC CCC AAC AGA ATG TTC CCC TTT ATT TTT	2619	2646
2673	CTT TCA TGT AAG GAC GCA TAT GCA TTT TGC TCA GCT ACC ACC CTT CAC TGC ATC CCA TTT TGA GAA GTG GTA TTT TCT	2700	2727
2754	TCA TTC ATC TGT TCT AGG TTT TTA AAA AAA TAT TTA AGA TCT TCT CTT TTT AAA GAA TCT GTT CAT TTG GAA TGT ACT TTT	2781	2808
2935	TGC ATT TTT ACT TGT GAA AAT ATG TAT TTA TCC TTT TTG TTA TGA ATG TAT GAC TTC ACT GTG TCA GAG AAT ATG GTC TTA	2962	2989
2916	AGA GAT ACA GAA AAC TTT TGA GAA TGA TAA GAT CTG GAC ATG CTA GAT GAA ATC AAA GCC CTG GAT GTC CTT GTT CAA GCT T	2943	

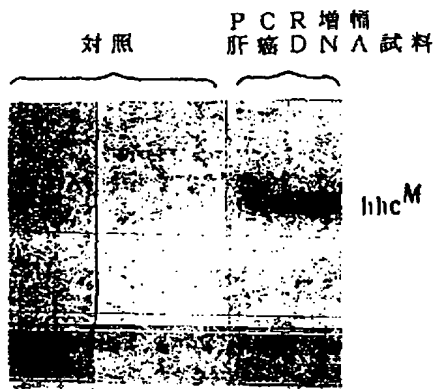
【第2図】



【第5図】

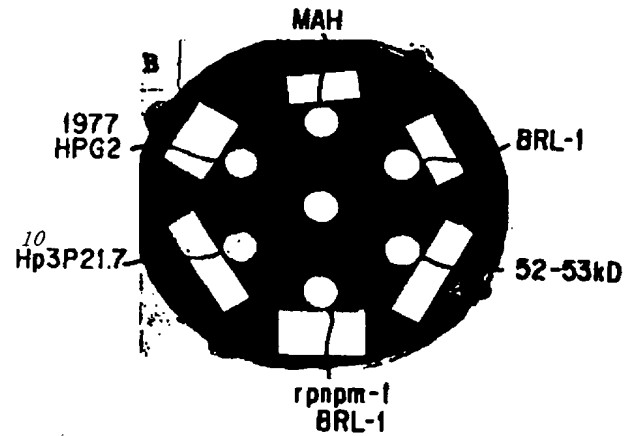


【第7図】



(³²P)-hbc^M DNA に対する
DNA-DNA ハイブリッド形成

【第6B図】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷

識別記号

C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/02
C 1 2 Q 1/68
G 0 1 N 33/569
33/574
33/576
C 1 2 R 1:91)

Z N A

F I

C 1 2 P 21/02
C 1 2 Q 1/68
G 0 1 N 33/569
33/574
33/576
C 1 2 N 5/00

C
Z N A A
L
B
B
B

- (56) 参考文献 特開 昭61-202693 (JP, A)
 特表 昭62-501010 (JP, A)
 Leukemia, Vol. 2, No. 12, p. 102S-113S (1988)
 Cancer Research (Suppl.), Vol. 50, p. 5658-5667 (1990)